

PEL細胞株に体するDHMEQの効果は一過性であり、処理したHHV-8感染PEL細胞株(BCBL1, TY1, BC1)の核抽出液を用いたEMSAで、NF- $\kappa$ B活性が1~3時間後に抑制されたが、効果は一過性で24時間後には回復する事が示されている(図1)。

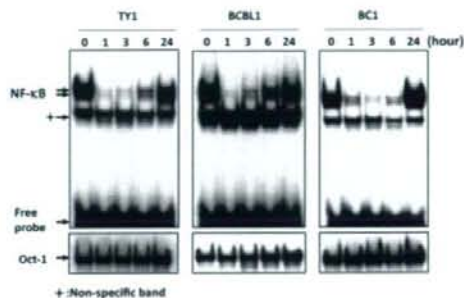


図1. DHMEQによる一過性のNF- $\kappa$ B活性化抑制。10 $\mu$ g/mlのDHMEQ処理後時間経過を追って各抽出液を調製しEMSA法によってNF- $\kappa$ BのDNA結合活性を検討した。

次に、DHMEQによるNF- $\kappa$ B活性抑制が遺伝子発現に与える影響をAgilent社のシステムで再検討した(図2)。

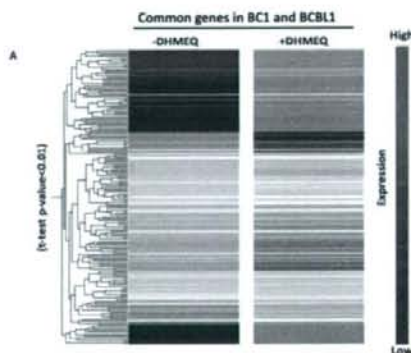


図2. DHMEQ処理によるPEL細胞の遺伝子発現変化。BC1細胞とBCBL1細胞で共通の変化を示す遺伝子群を抽出してクラスター解析を行った。

発現が有意に増加あるいは減少した遺伝子(t test p value<0.01)群を抽出した。その結果、発現抑制が認められた遺伝子は72、発現が誘導された遺伝子は71個となった。

NF- $\kappa$ B標的遺伝子の中で発現抑制が認められ

たものには以下のようなものがある。IL6, myc, CCR5, BCL-xL, cIAP2, NF- $\kappa$ B1  
また、抗アポトーシス遺伝子で発現抑制が認められた遺伝子には以下のものがある。

Bcl-xL, c-IAP2, NF- $\kappa$ B1, Birc5, IGF1R

一方、発現亢進が認められた遺伝子には以下のようなものがあった。

SSP1, VEGF, MIF, BAG3

プロアポトーシス遺伝子で発現亢進が認められた遺伝子には以下のものが有った。

DEDD2, CDKN1A, APOE, TNFSF10

細胞周期停止遺伝子で発現亢進の認められた遺伝子には以下のものがある。

CDKN1A, CDKN1B, PPP1R15A, DDIT3

これら発現が有意に変化した遺伝子群に関してGeneSpring GXを用いてGene Ontologyで解析した(図3)。

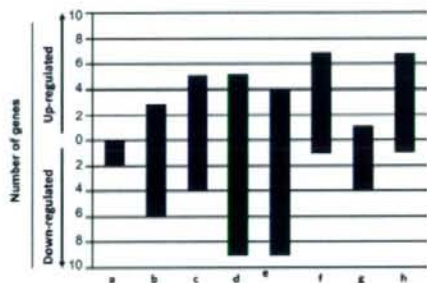


図3. Gene Ontology解析の結果。

グラフは以下のカテゴリーの遺伝子の数を示している。a, negative regulators of NF- $\kappa$ B import into nucleus; b, I $\kappa$ B kinase and NF- $\kappa$ B cascade; c, positive regulators of apoptosis; d, negative regulators of apoptosis; e, DNA repair; f, cell cycle arrest; g, cell cycle checkpoint; h, regulators of cyclin dependent protein kinase activity. 各領域は発現亢進あるいは抑制を示す遺伝子の数を反映している。

解析の結果、以下の機能群に属する遺伝子の発現抑制が認められた。

- (1) negative regulators of NF- $\kappa$ B import to the nucleus,
- (2) I- $\kappa$ B kinase and NF- $\kappa$ B cascade
- (3) negative regulators of apoptosis
- (4) DNA repair
- (5) cell cycle checkpoint.

一方、以下のカテゴリーに属する遺伝子につ

いては発現亢進の傾向が認められた。

(1) positive regulators of apoptosis

(2) cell cycle arrest

(3) regulators of cyclin dependent protein kinase activity

全体をまとめると、アポトーシス促進と細胞周期停止遺伝子の発現亢進の傾向と、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子、抗アポトーシスと DNA 修復にかかわる遺伝子の発現抑制が認められた。

従って、PEL 細胞における NF- $\kappa$ B の恒常的活性化は細胞の増殖と生存に必須な事象である事が示唆された。

## (2) B 細胞リンパ腫細胞に対する PKC 阻害剤の作用の検討

まず、実験に用いる培養細胞における各種 PKC 分子の発現と PKC $\beta$ の活性を評価した。Immunoblot による解析の結果、これらの細胞株では、PKC の $\alpha, \beta, \gamma$ および $\delta$ の発現が確認されたが、 $\theta$ の発現はいずれの細胞においても認められなかった (図4)。

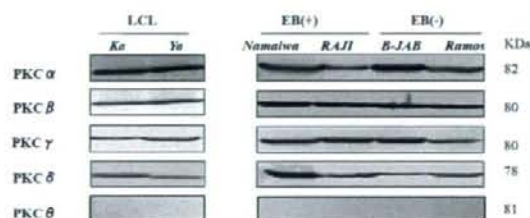


図4. B 細胞株における PKC アイソフォームの発現  
細胞株の whole cell extract を SDS-PAGE で分画後、PVDF メンブレンに転写し、各 PKC 特異抗体を用いてプロットした。

次に、B 細胞受容体からのシグナル伝達に必須の役割を持つ PKC $\beta$ についてその活性化状態を2つの方法で検討した。まず、SigmaTect Protein kinase C assay system (Sigma)を用いて測定したところ、これらの B 細胞株では、未刺激の状態では対照の TPA 刺激後の Jurkat 細胞と同等あるいはそれ以上の活性を示した (図5a)。従って、これらの細胞においては PKC $\beta$ の恒常的かつ強力な活性化が存在する事が示唆された。さらに、活性化 PKC は膜分画に存在する事から、生化学的に細胞質分画と膜分画に分けて

immunoblot 法によってその局在を解析した (図5b)。その結果、やはりこれらの B 細胞株全てにおいて、PKC $\beta$ の膜局在が確認できた。これらのデータを総合すると、B 細胞培養株では、EBV の感染の有無にかかわらず、PKC $\beta$ の高いレベルでの恒常的活性化が存在する事が示された。

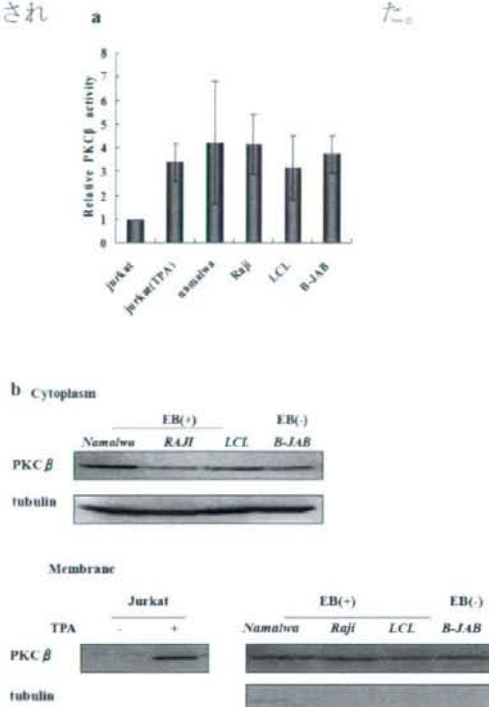


図5. B 細胞株における PKC $\beta$ の恒常的活性化。  
a) SigmaTect Protein kinase C assay system (Sigma)による測定結果。Jurkat 細胞の TPA 刺激有り無しの検体を対照としている。b) PKC $\beta$ の細胞内局在の解析。生化学的に細胞質と膜成分を分画し、それぞれを immunoblot 法で解析した。対照には TPA 刺激有り無しの Jurkat 細胞の検体を用いた。

次に、これらの細胞株に対する PKC $\beta$ 阻害剤 (Staurosporine) の影響を検討した。まず、細胞死の誘導について検討したところ、いずれの細胞も感受性を示したが、その程度は2群に分かれた。つまり、Raji 細胞と LCL は 0.065 $\mu$ M においても relative viability が 60%以上であり、Namalwa および B-JAB 細胞株が、10-20%であるのと比較して、相対的な耐性を示した (図6)。

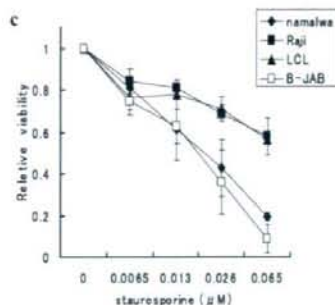


図6. PKC $\beta$ 阻害剤による細胞死誘導。

Staurosporine 添加4-8時間後に、WT-8 アッセイ生細胞数を評価し、相対的生存率で表現した。

次に、細胞死がアポトーシスによるものかどうかを検討するために、Staurosporine 添加後の細胞について、Caspase-3, -8, -9 の活性化の有無を green-fluorochrome-labeled inhibitors of caspase (FLCA)によって検討した。その結果、相対的な高感受性を示した Namalwa 細胞と B-JAB 細胞で明らかな活性化が認められたが、Raji 細胞と LCL では、活性化が低レベルであった(図7)。

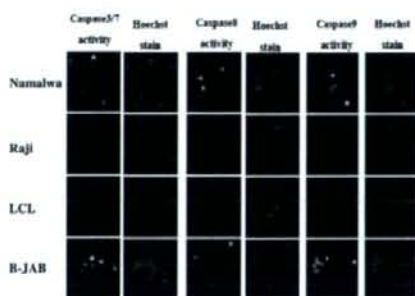


図7. Staurosporine 添加による caspase の活性化。

添加後8時間て細胞を固定し、それぞれの caspase の活性化を FLCA で検討した。また、Hoechst33342 染色の結果を右に示す。

更に、Staurosporine 処理による NF- $\kappa$ B 活性化に対する効果を EMSA 法で検討した。その結果、相対的に高い感受性を示した Namalwa 細胞と

B-JAB 細胞においては、NF- $\kappa$ B の活性化が強く阻害されていた。一方相対的な耐性を示した Raji 細胞と LCL では、ほとんど活性が阻害され

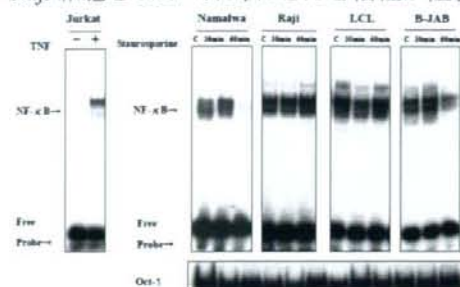


図8. PKC $\beta$ 阻害による NF- $\kappa$ B 活性の抑制。

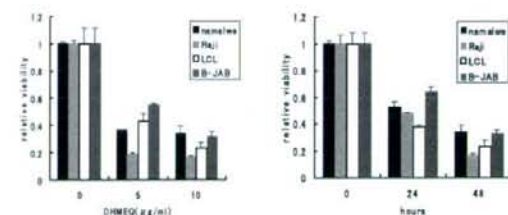
Staurosporine 処理後30分と60分で各抽出液を調整し EMSA を行った。EMSA の対照としては、Jurkat 細胞を用い、TNF $\alpha$ による NF- $\kappa$ B 活性化を示した。

ていなかった(図8)。

次に、NF- $\kappa$ B 阻害が細胞死に深くかかわっているかどうかを検討するため、NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ の作用を検討した。その結果、これら4種のB細胞株はいずれも DHMEQ に対して高い感受性を示した(図9)。以上の結果は、Staurosporine 感受性は、その NF- $\kappa$ B 阻害作用を介している事が示唆された。

図9. B細胞株に対する DHMEQ の効果。

各濃度の DHMEQ 添加後4-8時間、あるいは10 $\mu$ g/ml の DHMEQ 添加後各時間における生細胞の割合を示した。



次に、Staurosporine 感受性に影響する EB ウイルス側の因子を検討するため、NF- $\kappa$ B 活性化に深くかかわる LMP-1 の発現とそれへの TRAF2 蛋白質の会合レベルを検討した。その結果、相対的な耐性を示す Raji 細胞と LCL 細胞では LMP-1 の発現レベルが高く TRAF2 蛋白質の会合も強い事が明らかになった(図10)。



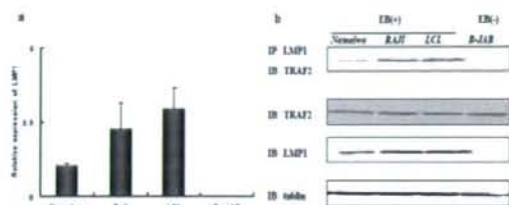


図10. 各細胞におけるLMP-1発現レベルの検討。  
 a) Real time RT-PCRによるLMP-1 mRNAレベルの検討結果。  
 b) Immunoblot法による蛋白質レベルでの発現解析。  
 LMP-1の発現レベルとTRAF2蛋白質の共沈レベルの検討

(3) エイズリンパ腫の遺伝子発現アレイ解析  
 都立駒込病院と国立感染症研究所で凍結保存されているエイズ合併リンパ腫検体計20サンプルを用いてRNAを抽出して発現アレイ解析を試みた。

発現アレイ解析を行うには検体のRNAのqualityが重大な影響を持つ。従って、まず、抽出したRNAのquality checkを行った。Agilent社のBio Analyzerを用いて解析したところ、いずれのサンプルも著しくdegradationしている事が明らかになった(図10)。

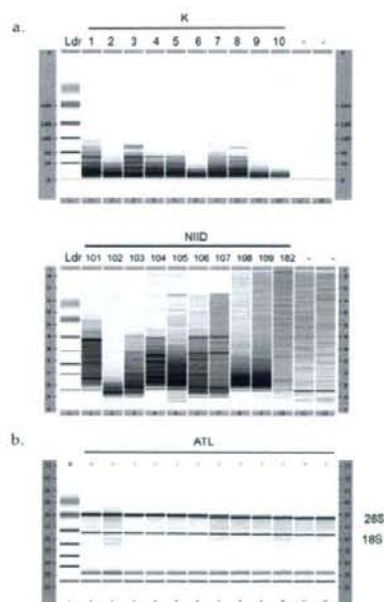


図10. エイズ合併リンパ腫のRNA品質チェック

Bio Analyzerの解析結果を示す。a. エイズリンパ腫検体の解析結果。b. 対照としてのATL細胞のRNA解析結果  
 28Sおよび18Sのribosomal RNAがシャープなバンドを形成している事が劣化の無いRNAの目安となる。

#### D. 考察

本年度は、昨年度に引き続き、PEL細胞に対するNF- $\kappa$ B阻害剤DHMEQの効果を遺伝子発現の包括的解析によって検討した。

その結果、DHMEQが一過性にNF- $\kappa$ Bの活性化を阻害することが確認された。24時間以内にNF- $\kappa$ Bの活性が回復するにもかかわらず、2日目以降は活性化NF- $\kappa$ Bの存在下でアポトーシスのプロセスが進行することになる。この現象がどのような分子機構によって担われているかは大変興味深い。今回の発現解析の結果は、一時的なNF- $\kappa$ Bの阻害が広汎な遺伝子発現の変化をもたらす事、全体で見ると抗アポトーシス系の遺伝子の発現抑制とプロアポトーシス系の遺伝子の発現亢進が認められる事が特徴である。これは、最近提唱されている“Oncogene addiction”および“Oncogenic shock”という概念に良く適合するデータである。

本年度は、新たにB細胞系リンパ腫に対するPKC $\beta$ 阻害剤の効果を、EBV陽性のNamalwa細胞、Raji細胞およびLCLとEBV陰性のB-JAB細胞を用いて検証した。本年度の実験結果から明らかになった事は、PKC $\beta$ 阻害剤Staurosporinに対する感受性が、恒常的に活性化しているNF- $\kappa$ Bを阻害できるかどうかと相関する事である。EBV感染B細胞株ではLMP-1の発現とTRAF2蛋白質との会合のレベルが高い細胞では、StaurosporinによるPKC $\beta$ の阻害にもかかわらずNF- $\kappa$ Bの活性化が維持されていた。従って、これらの細胞ではNF- $\kappa$ B活性がPKC $\beta$ 非依存経路、つまり、主にLMP-1からのシグナルでドライブされている事を示唆する結果と考えられる。さらに、EBV陽性リンパ腫の治療において、PKC $\beta$ 阻害剤の効果の限界を示唆する結果でもある。NF- $\kappa$ B阻害剤DHMEQがEBVの有無にかかわらず有効であった事は、両者の併用療法の有効性を示唆すると考えられる。

本年度の解析で、エイズ合併リンパ腫臨床検体を用いた発現解析は、現在の検体では実施困

難である事が明らかになった。今後は、プロスペクティブに検体の収集を行いアレイ解析可能なサンプルを準備するか、解析方法の見直しを考える必要が有る。プロスペクティブに患者検体を収集してマテリアルバンクを整備する事は必須の事であるが、患者数の少なさを考慮すると限られた期間内で発現アレイ解析の成果を期待する事は困難であると考えられる。従って、既存の検体を用いて有用な情報を取得する新たな実験計画を検討する事が必要であろう。この際、最近の技術開発の結果可能になって来た、高速シーケンサーを用いた全ゲノム解析を目指すのも一つの可能性であると思われる。

## E. 結論

今年度の結果から、DHMEQによるNF- $\kappa$ B有効な戦略であることを確認するとともに、PKC $\beta$ 阻害剤の応用はEBV陽性リンパ腫の場合、DHMEQとの併用を検討する必要が有ることを示唆するものと考えられる。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF- $\kappa$ B inhibitor DHMEQ. **Microbes Infect** 10:748-756, 2008
- 2) Suzuki K, Juelich T, Lim H, Ishida T, Watanabe T, Cooper DA, Rao S, Kelleher AD. Closed chromatin architecture is induced by an RNA duplex targeting the HIV-1 promoter region. **J Biol Chem** 283: 23353-23363, 2008
- 3) Watanabe M, Nakashima M, Togano T, Higashihara M, Watanabe T. Identification of the Rela domain responsible for action of a new NF $\kappa$ B inhibitor DHMEQ **Biochem Biophys Res Commun** 376: 310-314, 2008
- 4) Dabaghmanesh N, Matsubara A, Miyake A,

Nakano K, Ishida T, Katano H, Horie R, Umezawa K, Watanabe T. Transient inhibition of NF- $\kappa$ B by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation **Cancer Sci** in press

- 5) Yamagishi M, Ishida T, Miyake A, Cooper DA, Kelleher AD, Suzuki K, Watanabe T. Retroviral delivery of Promoter-targeted shRNA induces long-term silencing of HIV-1 transcription **Microbes Infect** in press

### 2. 学会発表

(国際発表)

- 1) Yamagishi M, Ishida T, Miyake A, Suzuki K, Watanabe T, Promoter-targeted shRNA driven by retroviral vector achieves long-term repression of HIV-1 replication, 11th Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, September 11-13, 2008, Maryland, USA

(国内発表)

- 1) 三宅在子, 石田尚臣, DewanMD, Zahidunnabi, 山本直樹, 梅澤一夫, 堀江良一, 渡邊俊樹, NF- $\kappa$ B阻害剤DHMRQを用いたエイズリンパ腫治療の基礎研究、第12回がん分子標的治療研究会総会、2008年6月26日-27日、東京
- 2) Nazanin Dabaghmanesh, 三宅在子, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 梅澤一夫, 堀江良一, 渡邊俊樹, Inhibition of NF- $\kappa$ B by DHMEQ in primary effusion lymphoma destroys cancer cells without induction of viral replication. 第12回がん分子標的治療研究会総会、2008年6月26-27日、東京
- 3) 神林佑輔, 鈴木絵里子, 渡邊俊樹, 堀江良一, 梅澤一夫, エイズ関連リンパ腫細胞の表現型解析とNF- $\kappa$ B阻害(-)DHMEQによる抑制、第12回がん分子標的治療研究会総会、2008年6月26-27日、東京
- 4) 三宅在子, 山岸誠, 石田尚臣, 渡邊俊樹, SIV LTRプロモーター領域を標的としたsiRNAによるSHIV増殖抑制機構の解析、第56回日本ウィルス学会学術集会、2008年10月26-28日、岡山
- 5) 山岸誠, 石田尚臣, 三宅在子, 鈴木一雄, 渡

邊俊樹、プロモーター標的shRNAを用いた  
HIV-1 の長期抑制効果とメカニズムの検討、  
第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年  
10 月 26-28 日、岡山

**H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）**

なし



## エイズ関連リンパ腫の分子病態に基づく治療法の開発

研究分担者： 片野 晴隆 （国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者： 菅野隆行 （国立感染症研究所感染病理部）  
渡邊俊樹 （研究分担者：東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻病態医療科学分野）  
比島恒和 （東京都立駒込病院病理科）  
梅澤一夫 （慶應義塾大学理工学部）

### 研究要旨

1. エイズ関連リンパ腫における蛋白リン酸化酵素阻害薬の抗腫瘍効果: Epstein-Barr virus (EBV)関連日和見リンパ腫はEBVの癌タンパクLMP1 (Latent membrane protein 1) 陽性でNF- $\kappa$ Bの恒常的活性化を特徴とする予後不良なリンパ腫である。われわれはJAK(Janus kinase), MEK(MAPK/ERK kinase)阻害薬が、日和見リンパ腫のモデルであるEBV感染不死化細胞を 2-20 $\mu$ Mの濃度で増殖を抑制することを見いだした。増殖抑制はLMP-1 の発現と関連しており、これらの阻害薬はエイズ関連EBV感染日和見リンパ腫の新たな治療薬の候補であると考えられた。

2. エイズ関連リンパ腫の遺伝子発現プロファイル（ウイルス）の検索: 近年EBV陰性エイズ関連リンパ腫が増加していることから、遺伝子発現プロファイルの違いによるエイズ関連リンパ腫の再分類を試みている。（研究分担者渡邊俊樹教授との共同研究）本年度はエイズ関連リンパ腫サンプル 20 例を収集し、基礎情報としてEBV, HIV, HHV-8 などのウイルスを検出した。

### A. 研究目的

エイズの治療としてHAART療法が導入されて以降、日和見感染症は減少したもののカポジ肉腫、リンパ腫などの悪性腫瘍の発生は増加傾向にある。HAART療法そのものが治療として効果のあるカポジ肉腫と異なり、エイズ関連リンパ腫は治療が困難で予後不良の疾患である。エイズ関連リンパ腫のうち、本邦では現在、約半数ほどはEpstein-Barr virus (EBV)陽性、LMP1(Latent membrane protein 1)陽性のEBV関連日和見リンパ腫に分類される。このリンパ腫は組織型としてはびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(Diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL)

の免疫芽球タイプ(immunoblastic variant)とよばれるものであり、さらにEBVの感染様式としてはlatency III、すなわち、すべての潜伏感染遺伝子を発現している状態である。EBVの主要な癌タンパクであるLMP1が陽性でNF- $\kappa$ Bは恒常的に活性化している。

このリンパ腫ではLMP1が活性化する様々なシグナル経路が形質転換に重要である。LMP1が誘導するシグナル経路にはおおまかに、NF- $\kappa$ Bを活性化する経路、AP-1を活性化する経路、Jak-Statの経路の3つが知られている。いずれも転写因子の活性化から最終的には細胞増殖や抗アポトーシスなどの効果をもたらす。これらの経路はLMP1の細胞質内C末端にTRAF、

TRADD, JAK3などが結合する活性化ドメインCTAR(C-terminal activation region)1, 2, 3があり、これらを介して最終的にはNF-kB, AP1, STAT3といった転写因子の活性化を引き起こす。

昨年度は高コレステロール血症治療薬として用いられているHMG-CoA還元酵素阻害薬(スタチン)とNF-kB阻害剤dehydroxymethylepoxyquinomycin (DHMEQ)の併用療法について、EBVで形質転換したヒトB細胞 lymphoblastoid cell line (LCL)をモデルに、in vitroおよびin vivoにおける抗腫瘍効果を検討し、その結果、in vitroにおいては抗腫瘍効果の増強が認められたもののin vivoにおいては明らかな増強効果が認められなかった。そこで本年度はスタチンとの併用療法に使用可能な新たな治療標的の探索を目的とした。スタチンは接着因子LFA-1の機能阻害、lipid raftの廃絶によるLMP1シグナルの抑制、DHMEQはNF-kBそのものの核内移行の抑制によるNF-kB恒常的活性化の抑制が抗腫瘍効果をもたらすと考えられ、どちらも最終的にはNF-kBを標的としている。そこで今回は、治療標的としてLMP1により活性化するNF-kB以外の転写因子 AP-1, STAT3に着目した。そしてAP1, STAT3の活性化につながるMEK-ERK, JAK-STATの2つの経路を阻害するMEK阻害薬, JAK阻害薬について検討した。

一方で、HAART導入後、本邦ではEBV陰性エイズ関連リンパ腫も増えてきている。これらのリンパ腫の組織型はEBV関連日和見リンパ腫と同様にDLBCLであるが、その発症機構はほとんど知られていない。本分担研究のもう一つの課題はこうした近年のエイズ関連リンパ腫を遺伝子発現プロファイルなどから分子病態ごとに再分類することである。本年度はエイズ関連リンパ腫20例を収集し、そこに含まれるウイルスを検出し、遺伝子発現プロファイル検索の基礎情報とする。

## B. 研究方法

### 1. 細胞培養

EBV感染ヒトB細胞LCL(5種類)、EBV陽性LMP1陰性バーキットリンパ腫細胞株 Raji、EBV陰性バーキットリンパ腫細胞株 BJAB、Ramos は10%牛胎児血清添加 RPMI1640 (抗生

物質添加) 中で37°C 5% CO<sub>2</sub> の培養器にて培養を行った。JAK阻害剤(Calbiochem社 #420097)、MEK阻害剤 U0126 (プロメガ社) はdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解後、目的濃度になるように培養上清に加えた。

### 2. 細胞増殖アッセイ

細胞増殖は Cell Proliferation Kit II (XTT) (ロシュ・ダイアグノスティクス社)により測定した。試薬添加群のコントロール群としてDMSOを同濃度に添加した細胞を用いた。

### 3. 細胞周期分析、アポトーシス誘導の検討

2x10<sup>4</sup>(4)/mlの細胞に試薬添加3日後に70% EtOH固定、PI染色し、DNA量をフローサイトメーター(partec社)で測定さらにFlowJoソフトウェア(Digital Biology社)にて解析を行った。アポトーシス誘導の有無の検討はAnnexin V FITC Apoptosis Detection Kit(BD Bioscience社)を用いて行った。

### 4. NF-kB活性 (EMSA法)

2x10<sup>4</sup>(4)/mlの細胞に試薬添加3日後に核分画抽出を行い、LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (PIERCE 社)を用いて解析を行った。

### 5. エイズ関連リンパ腫20例におけるウイルスの検出

国立感染症研究所感染病理部、および東京都立駒込病院病理科に保存してあるエイズ関連リンパ腫の凍結標本20例につき、EBV, HHV-8, HIV の検索を行った。組織型はすべて diffuse large B cell lymphoma であり、生検、または剖検時に採取し、凍結保存後、DNA・RNA 抽出した。ウイルスの検出はリンパ腫から抽出したDNAを用いて、通法のPCRを行った。EBVはW-region, HHV-8はORF26, HIVはgag領域を標的とした。また、内因性コントロールとしてbeta-globin 遺伝子の増幅を行った。

### (倫理面への配慮)

ヒト由来試料(エイズ関連リンパ腫の凍結標本)の検索に関して、サンプルはすべて匿名化された状態で使用され、研究計画は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会による承認を受けた(承認番号156, 157)。



## C. 研究結果

### 1. エイズ関連リンパ腫における蛋白リン酸化酵素阻害薬の抗腫瘍効果

#### 1) JAK阻害剤、MEK阻害剤によるLCLの増殖に与える効果

JAK阻害剤、MEK阻害剤を $2\mu\text{M}$ の濃度で添加し4日目に細胞増殖アッセイを行うとLCLの増殖抑制効果が認められた。この抑制効果はEBV陽性LMP1陰性のRajiやEBV陰性LMP1陰性のBJABに対しては効果が認められないか、効果はごくわずかであった。LMP1陰性のリンパ腫細胞株に増殖抑制効果を示すDHMEQと異なり、JAK阻害剤、MEK阻害剤はLMP1陽性のLCLに対して選択的に増殖抑制効果がみられ特異性が高いと考えられた。またこの増殖抑制効果は $2\text{-}20\mu\text{M}$ の濃度で濃度依存的に認められた (図1, 2)。さらに、LCLが増殖するとき認められるクランプ形成について、薬剤添加後4日目に顕微鏡下で観察したところ、スタチンと同様にクランプ形成は認められなかった。(図3)

#### 2) JAK、MEK阻害剤による細胞周期への影響およびアポトーシス誘導

JAK、MEK阻害剤 $2\mu\text{M}$ で3日間処理したLCLではアポトーシスの誘導は明らかではなかった。コントロール群ではG0G1期の細胞は51.8%であったが、MEK阻害剤、JAK阻害剤の添加によりそれぞれ60.1%、52.9%とG0G1期の細胞が増加した。アポトーシスを誘導するスタチンと

Cell proliferation assay (XTT assay), Day 4

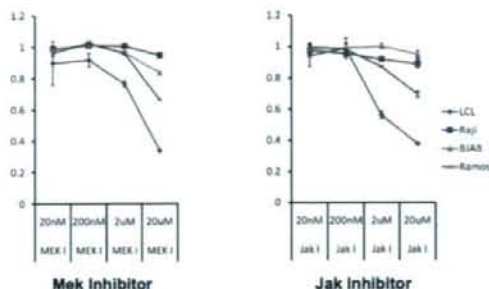


図2 JAK阻害剤、MEK阻害剤ともに $2\text{-}20\mu\text{M}$ の濃度で濃度依存的にLCLの増殖を抑制した。

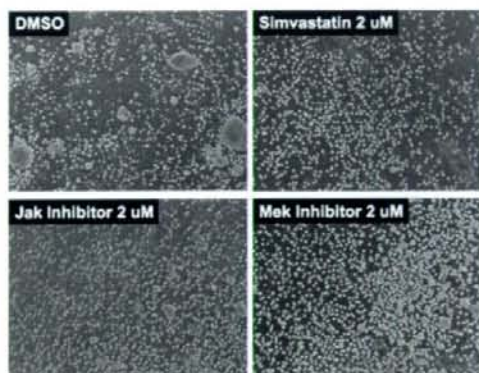


図3 JAK阻害剤、MEK阻害剤ともにLCL増殖の際に認められるクランプの形成が消失した。

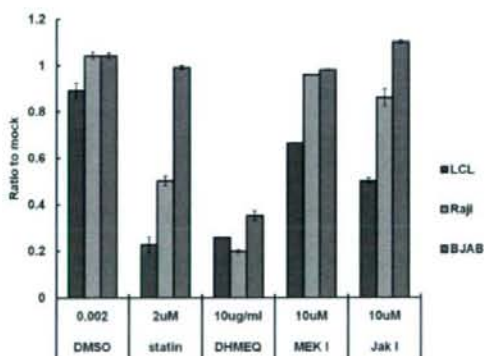


図1 JAK阻害剤、MEK阻害剤添加3日後のXTT assayによる細胞数の解析結果を示す。ともにLCLの増殖を抑制する。スタチン、DHMEQと比較してLMP1陽性のLCLに対して特異性が高いと考えられる。

は異なる機序で増殖抑制が occurring していると考えられた。

#### 3) JAK、MEK阻害剤によるNF- $\kappa$ B活性の変化

LCLの増殖にはNF- $\kappa$ Bの構成的活性化が重要な役割を果たしていると考えられている。JAK阻害剤、MEK阻害剤添加群のNF- $\kappa$ B活性をEMSA法にて検討したところ、JAK阻害剤では変化が見られなかったが、MEKを $20\mu\text{M}$ 加えた群で活性低下が認められた (図4)。これはJAK阻害剤はNF- $\kappa$ Bの活性化を阻害せず、NF- $\kappa$ Bとは異なる経路を標的としていることを示している。



図4 MEK 阻害剤 20  $\mu$ M で NF-kB の活性が抑制されたが、JAK 阻害剤の影響は明らかではなかった。

## 2. エイズ関連リンパ腫の遺伝子発現プロファイル (ウイルス) の検索

日本人エイズ関連リンパ腫の遺伝子発現プロファイルを明らかにする目的でエイズ関連リンパ腫サンプル 20 例を収集した。このサンプルにつき、これまでエイズ関連リンパ腫との関連が明らかにされている EBV, HHV-8、および HIV につき、conventional PCR で検出を試みた。結果、EBV は 20 例中 18 例に検出され、一方で HHV-8 の検出されるサンプルはなかった (図 5)。HIV は DNA PCR で 20 例中 6 例に検出された。EBV のウイルス量は 1 細胞当たり 1 コピー以上のサンプルが 12 例であり、残り 6 例は 1 細胞当たり 0.1 コピー以下であった。HIV は多くの症例で 1 細胞当たり 0.01 コピー以下と低コピー数であったが、1 例のみに 1 細胞当たり 3 コピー程度の高いコピー数が検出された。この症例では HIV のインテグレーションが疑われた。

## D. 考察

EBV 陽性のエイズ関連日和見リンパ腫は LMP1 によるさまざまなシグナルの活性化が形質転換に関わっている。なかでも NF-kB の恒常的活性化がもっとも重要と考えられている。DHMEQ は NF-kB を直接の標的としており、ス

タチンと DHMEQ の併用を検討した昨年度の本研究では、併用による増強効果が明らかではなかった。LCL に対するスタチンの効果は接着因子の機能阻害と lipid raft 上の LMP-1 の 3 量体形成を阻害し、LMP-1 のシグナル伝達そのものを阻止するところにある。今回我々はスタチンとの併用療法を念頭に置き、LMP1 による形質転換に関わる主な転写因子 NF-kB, AP-1, STAT3 のうち NF-kB 以外の AP-1 の活性化につながる MEK/MAPK の経路、STAT3 の活性化につながる JAK3/STAT3 の経路をブロックする MEK 阻害薬、JAK 阻害薬の効果について検討した。

JAK 阻害薬、MEK 阻害薬ともに LCL の増殖抑制効果を認めたが、スタチン、DHMEQ などこれまでに効果が確認された薬剤に比べて影響は弱い。とくに JAK 阻害薬については IC50 が 1-20nM であることを考えると 2-20 $\mu$ M での効果はかなり投薬強度が強い状況での影響をみていることとなる。今回使用した JAK 阻害薬は JAK1, 2, 3, Tyk2 を阻害することがわかっているが、それ以外にも多くの蛋白リン酸化酵素の活性を数百 nM の濃度で阻害することがわかっている。今後より特異性の高い薬剤を使用し詳細に標的となる蛋白リン酸化酵素を絞り込む必要があると考えられる。一方で JAK 阻害薬による NF-kB 活性の抑制効果が見られなかったことから、NF-kB を標的とするスタチンなどの薬剤との併用では増強効果が期待できる。また LMP1 陽性細胞に特異性が高いことからエイズ関連 EBV 感染日和見リンパ腫の新たな治療薬として有力な候補になるかもしれない。一方で MEK 阻害薬は JAK 阻害薬に比べてやや効

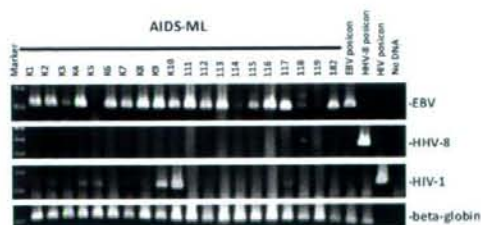


図5 エイズ関連リンパ腫 20 例における EBV, HHV-8, HIV の検出。



果が弱く、20 $\mu$ MではNF- $\kappa$ B活性の抑制が認められたのでスタチンとの併用を考える上では注意を要する。これまでLCLを用いて日和見腫瘍の治療薬として開発されてきたものはNF- $\kappa$ Bの活性阻害を目指したものが多い。今回われわれが使用したMEK阻害薬とJAK阻害薬はLMP1陽性細胞に特異性が高い点では有望で、今後、より詳細に標的を絞り込んでいくことで新たな治療薬の開発につながると考えられる。

近年のエイズ関連リンパ腫の分子病態を明らかにするためには、いくつかの複合的手段を駆使する必要がある。EBV陽性リンパ腫はいまだに半数を占め、これらはEBVによる日和見リンパ腫として分類することができる。問題はEBV陰性リンパ腫であり、これらは共通の遺伝子異常や染色体転座などを持たない。一般に、EBV、HHV-8以外のウイルスが直接的にリンパ腫発症と関連する可能性は低い。今回、EBVは2例で陰性であったが、PCRは感度が高いため、病因と関連しない、by standingなウイルスを検出している可能性もある。また、組織学的にはEBERのin situ hybridizationがEBVの検出には信頼のある手法とされるが、PCRの結果とは合致しない症例も存在した。EBVのPCRの結果は強いバンドと弱いバンドが混在しており、EBV量が一定ではないことが伺える。定量的PCRでは1細胞当たりのコピー数が1を越えている症例は12例に過ぎず、8例はEBV陰性、または低コピー数であり、病態と関連していない可能性がある。今後、EBVコピー数により、遺伝子発現プロファイルが変化するかどうか、検討が必要である。HIV陽性のリンパ腫はきわめて珍しく、以前我々が報告した例ではHIVがStat3遺伝子上流にインテグレーションし、stat3遺伝子発現の亢進を誘導し、リンパ腫発症に関連していた。今回の検索でも1例に高コピー数のHIVが検出されており、今後の解析対象としたい。

## E. 結論

1. LMP1を標的とし、JAKおよびMEK阻害薬が、LCLを2-20 $\mu$ Mの濃度で増殖を抑制することを見いだした。LMP-1の発現細胞特異的に増殖効果が見られ、これらの阻害薬はエイズ関連

EBV感染日和見リンパ腫の新たな治療薬の候補であると考えられた。

2. エイズ関連リンパ腫の遺伝子発現プロファイルの解析のため、エイズ関連リンパ腫サンプル20例を収集し、基礎情報として、EBV、HIV、HHV-8などのウイルスを検出した。その結果、すくなくとも2例のEBV陰性リンパ腫が含まれていることが分かった。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Dewan, MZ, Takamatsu, N, Hidaka, T, Hatakeyama, K, Nakahata, S, Fujisawa, J, Katano, H, Yamamoto, N, Morishita, K. Critical role for TSLC1 expression in the growth and organ infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo. *J Virol*. 82:11958-11963, 2008.
- 2) Dewan, MZ, Tomita, M, Katano, H, Yamamoto, N, Ahmed, S, Yamamoto, M, Sata, T, Mori, N, Yamamoto, N. An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor- $\kappa$ B and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. *Int J Cancer*. 124: 622-629, 2009.

### 2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 片野晴隆, 菅野隆行, 佐多徹太郎. 定量的PCRによる網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイル 第97回日本病理学会総会 2008.4 金沢
- 2) 菅野隆行, 佐多徹太郎, 片野晴隆. RTA発現レベルの異なるKSHV感染細胞におけるウイルス感染維持 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年11月, 岡山.
- 3) 片野晴隆, 加納基史, 中村智之, 菅野隆行, 浅沼秀樹, 佐多徹太郎. 定量的PCRによる網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイ



ルの解析, 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 11 月、岡山。

- 4) 片野晴隆、中村智之、菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎, KSHV 感染における KSHV 全遺伝子発現プロファイルの解析, 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 11 月、岡山。
- 5) 片野晴隆、佐多徹太郎, エイズ関連リンパ腫およびエイズ剖検例の各臓器における多種類ウイルスの定量, 第 22 回日本エイズ学会学術集会 2008 年 12 月、大阪。

#### H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし

## B 細胞腫瘍化の主因である EBV を標的にした治療法開発

分担研究者 駒野 淳国立感染症研究所 エイズ研究センター 主任研究官

**研究要旨** 悪性リンパ腫はエイズに伴う悪性腫瘍としては日本で最も多く、エイズ発症の初発疾患として顕れることもあり、治療が最も困難なエイズ関連疾患である。日本人におけるリンパ腫治療は未だ研究的な段階であり、その病因を同定し最適な治療法を確立することはエイズの予後を決する重要なファクターとなる。エイズリンパ腫が予防できれば HIV-1 感染者の予後/QOL を大きく改善できる。そこで、本研究ではエイズリンパ腫のうちその多くの割合を占める EBV 陽性の B 細胞性リンパ腫に着目した。EBV 陽性 B 細胞性リンパ腫では特異的治療標的分子として EBV 潜伏感染関連核抗原 EBNA1 が指摘されているが、その分子標的候補としての評価は依然確立していない。本研究により EBNA1 阻害により B 細胞不死化関連ウイルス抗原発現が抑制され、エイズに合併する EBV 陽性 B 細胞性リンパ腫の発生が抑止できる可能性が示唆された。EBV 陽性 B 細胞性リンパ腫予防の分子標的としての EBNA1 の評価を確立できたことをうけて、dominant-negative EBNA1 mimicking inhibitor の開発が期待される。

## A. 研究目的

悪性リンパ腫はエイズに伴う悪性腫瘍としては日本で最も多く、エイズ発症の初発疾患として顕れることもあり、治療が最も困難なエイズ関連疾患である。しかし、リンパ腫治療は未だ研究的な段階であり、その病因を同定し特異的治療法を確立することはエイズの予後を決する重要なファクターとなる。エイズリンパ腫のうち、EBV 陽性の B 細胞リンパ腫はその多くの割合を占めており、リンパ腫の原因が EBV の存在に依存することが明らかである点において他のリンパ腫と異なる。Epstein-Barr virus (EBV) は多くの成人が感染しているヒトヘルペスウイルスである。また、EBV はパーキットリンパ腫や上皮性腫瘍といった、多くのヒト細胞の腫瘍化に関連するとされている。現在

EBV 陽性の B 細胞リンパ腫には特異的な治療標的分子として EBV タンパク質の存在が指摘されている。その治療標的としての重要性は近年指摘されているにもかかわらず、予防の分子標的候補としての評価には依然確立していない。

EBV の B 細胞への感染は吸着、脱殻が起こり、ウイルスゲノムは核へと移行する。EBV ゲノムの両端には末端反復配列 (Terminal Repeat : TR) が存在し、細胞の核に侵入するとこの領域を介して環状化する。EBV ゲノムには潜伏感染時の複製起点として *oriP* がコードされており、宿主ゲノムと同期して複製し、娘細胞へと分配されて維持される。EBV ゲノムからは核抗原の EBNA2 と EBNA-LP が最初に発現する。転写活性化因子の EBNA2 は宿主の遺伝子の発現をトランスに増強して細胞を増殖させると同時に、

EBV ゲノム上の EBNA2 responsive element に結合して C プロモーターからのウイルス遺伝子の発現を増強する。これによって他の EBNA とともに EBNA1 が発現する。EBNA1 は *oriP* に結合して、EBV ゲノムの複製と C/W プロモーター (C / Wp) を活性化する。これにより更に EBNA が発現する。加えて潜伏感染膜タンパク質 (Latent membrane protein : LMP-1 / -2) の発現も活性化される。EBER も感染細胞中に大量に発現し、増殖因子の自己分泌の誘導等を介して B 細胞の悪性形質維持に関与している。以上のメカニズムによって、EBV は B 細胞を悪性形質転換しその形質を維持する。

EBV による発ガン活性を阻害するために、現在までに EBNA2、EBNA1、LMP-1 を創薬標的として研究が行われてきた。EBNA1 は EBV ゲノムの複製・維持とウイルス遺伝子転写の活性化という B 細胞の悪性化に関わる重要なタンパク質であるため、我々は創薬標的として特に注目している。EBV ゲノムの複製とウイルス遺伝子の転写の活性化は、*oriP* を構成する family of repeat (FR) と dyad symmetry element (DS) の EBNA1 binding site (EBNA1 BS) へ EBNA1 が結合することによって起こる。EBNA1 BS は FR に 20、DS に 4ヶ所存在する。DS への EBNA1 が結合することにより、EBV ゲノムの複製が促進する。また EBNA1 が *oriP* に結合すると、エンハンサー機能が活性化する。それにより C / Wp が活性化して、ウイルス遺伝子の転写が増強する。加えて EBNA1 は EBV ゲノムと宿主ゲノムを結合させることによって、EBV ゲノムを効率的に娘細胞へ分配させる。

現在までに、EBNA1 の核移行シグナルと二量体化ドメイン以外を欠失させた EBNA1 変異体である dominant-negative EBNA1(DNE1)を発

現させることによって、EBV が感染した B リンパ腫細胞や上皮系腫瘍細胞株から EBV のゲノムを脱落させ、悪性増殖形質を低下させることが報告されている (Kennedy et al, PNAS 2003; Nasimuzzaman, et al Mol Therapy 2005)。しかしリンパ腫の治療・予防のための分子標的候補評価において、ウイルスの感染を防止するための分子標的であるかどうかは依然検索されていない。本研究は EBNA1 の阻害剤として DNE1 を使用し、DNE1 発現細胞が EBV 感染に対する抵抗性を獲得できるかを評価することを目的として、これを通じて EBNA1 に対する治療・予防のための分子標的候補としての評価を行い、新たな原因特異的リンパ腫治療および予防法開発に資することを目的とする。

## B. 研究方法

(1) DNE1 発現ベクターの構築: DNE1 を GFP との融合タンパク質として発現するレトロウイルスベクター-pCMMP GFP DNE1(GD)を構築した。DNE1 は Kennedy et al, PNAS 2003 に記載されているものを使用した。これは nuclear localization signal および dimerization and DNA binding domain のみを有するアミノ酸 377-391(NLS) から 451-641(DNA binding and dimerization domain) までを GFP の N 末端側に融合させるように構築したものである。pCMMP は CMV と MLV LTR の融合プロモーターから遺伝子発現を誘導する哺乳類細胞遺伝子発現ベクターでもあり、遺伝子の発現と機能解析も本ベクターにて行った。また陰性コントロールとして GFP のみを発現する pCMMP GFP を使用した(Komano et al., Mol Biol Cell 2004)。EBNA1 依存的転写を抑制するかについては、EBNA1 依存的プロモーターにて luciferase を発現する FR-tk-Luc と EBNA1 を 293T 細胞へ



cotransfectionすると同時にGDまたはGFP発現ベクターを導入して転写レベルの減少を luciferase 活性にて測定した。特異性を検討するためにCMVプロモーターにより luciferase を発現するベクターを使用した。

(2) レトロウイルスベクターによる DNEI 発現ユニットの transduction : pCMMP,pVSV-G,pMDgag-polを同時に293T細胞にトランスフェクションして2日後に培養上清を回収して0.45umでfilterしたものをウイルス液とした。ウイルス液には polybrene を添加した。これを B cell acute lymphocytic leukemia である EBV 陰性細胞株 B-ALL に感染させた。B-ALL細胞を0.5-1.0x10<sup>5</sup>個準備しこれにウイルス液1 ml に resuspend して4°Cで1時間 rotate し細胞にウイルスを吸着させた後、培養液に置換して培養を続けた。Gene transduction は GFP 蛍光により検出し、GFP 陽性細胞を sorting し、細胞増殖、形態等に関する基礎的検討を行った。

(3) DNEI 発現細胞に対する EBV 感染と EBV 遺伝子発現およびゲノム維持に関する検討 : GD または GFP を導入した B-ALL 細胞に対し EBV B95-8 株を polybrene を欠く条件下で MLV と同様の protocol にて感染させた。感染後およそ2週間にわたってウイルス遺伝子発現およびウイルスゲノム維持に関する検討を PCR にて行った。ウイルスの細胞への吸着は感染後3回細胞を培養液で洗浄した細胞由来のウイルスゲノム量にて、感染後のウイルスゲノム核内移行は感染後1日目の核内 DNA 中におけるウイルスゲノム量を BamHI W fragment に対する PCR primer を用いてそれぞれ quantitative PCR にて定量した。これは cellular genomic DNA 重量あたりの EBV genome W 断片検出量をコピー数としてあらわした。また、感染細胞における

ウイルス遺伝子発現は細胞の total RNA を使用した end point semi-quantitative RT-PCR および quantitative RT-PCR にて検討した。EBER1 と LMP-2A の primer は過去に記載されたものを使用し、その reference は Brooks et al., J Virol 1993; Miller et al., J Virol 1993; Busson et al., J Gen Virol 1995; Bell et al., J Gen Virol 2006 である。C/W promoter からの転写産物は W1/W2 exon を標的にした primer を使用し、その配列は以下の通りである : 5'-cccteggacagctcctaag-3', 5'-cttcaactcggtctccccta-3'。PCR の特異性は virus 非感染 B-ALL で amplicon が増幅されない事、EBV-immortalized B-LCL で amplicon が増幅されること、amplicon の核酸配列により検証した。(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

### C. 研究結果

(1) DNEI 発現ベクター-pcmmp GD の構築 : Luciferase assay の結果、EBNA1 の発現によりルシフェラーゼ活性は約12倍に増加した。これに加えてGDを共発現させると、プラスミド量依存的にルシフェラーゼ活性が低下した。一方、pcmmp GD のかわりに pcmmp GFP を、FR-TK-Luciferase のかわりに CMV Luciferase を使用しても同様の現象を認めなかった。以上より我々の作製した GD に dominant-negative EBNA1 の活性があることが確認できた。(図1)。

(2) レトロウイルスベクターによる DNEI 発現ユニットの transduction : BALL 細胞にウイルスを感染後2-3日後に GFP 陽性細胞が現れ、その割合はおおよそ20-50%であった。100%陽性の細胞集団を得るため、FACS sorting により GFP 陽性細胞を bulk collection した。GFP 蛍光レベルが高いものと低いものを収集し相互に比較した。これらの細胞における GFP および

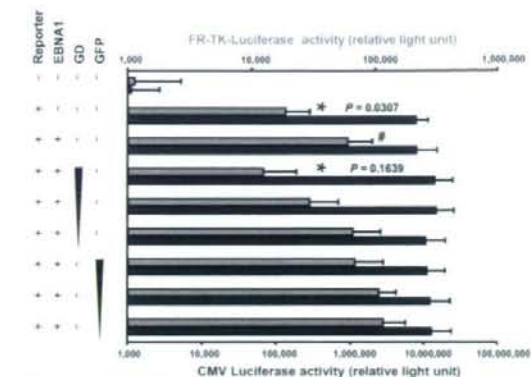


Fig. 1 EBV感染細胞への遺伝子トランスクリプションによる EBNA1とGDの発現

GDの発現は293Tと同様にWestern blottingにて確認された。細胞増殖および細胞形態はGFP, GD発現により明らかな違いを呈することはなかった。GDは核移行シグナルによって主として核に局在したが、GFPは細胞質と核に均一に存在した。GDはEBNA蛍光補体法でも核内に点状シグナルとして検出された。

(3) DNE1発現細胞に対するEBV感染とEBV遺伝子発現およびゲノム維持に関する検討: 増殖速度のほぼ同じB-ALLのGFP, GD細胞を使用してEBV感染に対するGDの影響について検索した。EBV感染に対するGDの影響を解析するために、EBV感染から15時間後までのウイルス挙動を、感染後細胞に吸着したEBVゲノム量と感染後15時間後に細胞の核内に到達したEBVゲノム量を比較することにより解析した。EBVゲノム量はBamHI W repeatを標的とするReal-Time PCRにて定量した。この標的は1ゲノム中に約10コピー反復しているため、検出効率を高くすることが出来る。GD細胞ではGD発現量の違いに関らず核移行ウイルスゲノム量は漸減し、その効率はそれぞれ47-66%と58-68%とほぼ同程度であった。ウイルスゲノム量減少率は感染後から一定で、GFPとGD発現細胞間でもGD発現レベルが異なる細胞間でも有意な差を認めなかった(図2)。GDによるEBVゲノム脱落効率に対する影響を

解析するため、上記に加えてEBV感染直後から2週間後までの細胞内ウイルスゲノム量の推移を同様に解析した。GD細胞ではGDの発現量の違いに関らずEBVゲノム量は細胞分裂1回あたり約10-16%の比率で漸減し、その程度はGFP発現細胞とほぼ同程度であった。2回の独立したB-ALL細胞とBJAB細胞へのEBV感染実験で同様の結果を得た。以上よりB細胞でのEBVゲノム脱落効率は約10-16%であり、

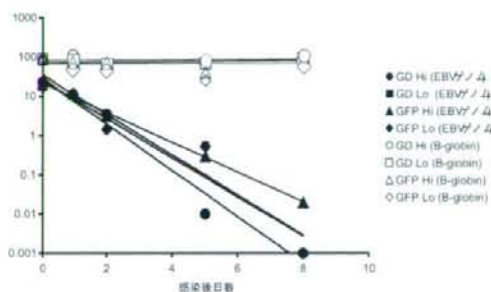


Fig. 2 GD/GFP細胞におけるEBVゲノムの核内移行効率とゲノム維持効率

GD発現はEBVゲノム脱落効率に影響しないことが判明した。なお、感染後は細胞をアシクロビルを含むメディアウムで培養して溶解感染細胞を除いているため、検出されたEBVゲノム量は潜伏感染細胞のみを反映している。GDによるEBV遺伝子転写に対する影響を解析するため、EBV感染から2日後の細胞におけるEBV遺伝子産物としてC/Wp由来転写産物、LMP2AのmRNA、EBER1 RNAについてReal-Time RT-PCRにて解析した。C/Wp由来転写産物はB細胞の悪性形質転換・維持を担うEBV遺伝子EBNA1/2/3をコードする。検出効率を上げるため、mRNA内の反復配列W1とW2エクソンを標的とした。C/Wp由来転写産物はGFP細胞で検出されたが、GD細胞では検出限界以下であった。EBER1の発現はGFP, GD両方の細胞にほぼ同程度検出された。LMP2Aの発現は



全ての細胞で検出限界以下であった (図3)。2回の独立した B-ALL 細胞への EBV 感染実験で同様の結果を得た。以上より GD は EBV ゲノムからの C / Wp 由来の転写を特異的に抑制することが判明した。

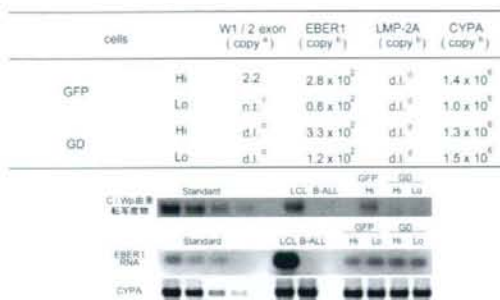


Fig. 3 GDによる各遺伝子の転写効率への影響とアンピシリンの電気泳動像  
GD / GFP細胞のRNAに対して各プライマーを用いて Real-Time RT-PCRを行い、1反応あたりを検出されたコピー数を示した。1反応あたりのRNAのテンプレート量は、a: 13-14 ng, b: 200 ngを用いた。cは未実験、dは検出限界以下を示す。

#### D. 考察

EBV感染に対するdnE1の活性をB細胞において評価したのは、我々が初めてである。Sugdenらが行ったように、上皮系細胞での一過性トランスフェクションにおいてdnE1はoriPプラスミドの脱落を促進する活性を示す。ところが、GDはB-ALL細胞とBJAB細胞において、感染でもたらされるEBVゲノムの脱落を促進することは出来なかった。一方、GDによるEBVゲノムからのEBNA1依存的転写抑制は観察された (LAST FIGURE)。これと同様の転写抑制がdnE1を発現させたEBV陽性リンパ腫細胞においても観察されている。以上の結果より、GDはEBVゲノムの複製・維持よりも転写に対してより大きな影響を与えると考えられる。

GDの転写とEBVゲノム複製への影響：EBVゲノムの複製と転写へのGDの作用は、ともにoriPへのEBNA1結合阻害に由来する。それにも関わらず転写への影響が大きく検出され

たのは、(1) EBVゲノムの複製・維持に比べて転写促進はEBNA1をより多く必要とする可能性と、(2) 感染直後のEBVゲノムの複製・維持は、樹立されたEBV潜伏感染細胞よりもEBNA1依存度が低い可能性が考えられる。

(1)の可能性はKennedyらがEBV陽性B細胞腫瘍株でdnE1効果を解析した際にも同様に指摘されている。WysokinskiらはoriPプラスミドを用いて転写とEBVゲノムの複製・維持におけるEBNA1 BSの必要数をEBV陽性細胞株であるRaji細胞において解析した。その結果、転写に必要なEBNA1 BSの数はEBV DNAの複製・維持より多かったと報告している。これはGDの効果が転写でのみ観察できた我々のデータとよく合致する。(2)の可能性はLeightらの報告によって裏付けられる。彼らはEBVゲノムのモデルとしてoriPプラスミド (約10kbp) を使用して、安定したoriPプラスミド保持細胞からのプラスミド脱落効率は細胞周期ごとに約4%であると報告している。我々の実験からEBVを感染させたB細胞からの脱落効率は約10-16%であり、上記の2.5-4倍である。これは安定なEBNA1 / oriP依存的EBVゲノム複製は感染後すぐには確立できず、EBNA1 / oriPシステムが感染直後に十分に機能していないことを示唆している。一方、Leightらによると、トランスフェクションによって一過性にoriPプラスミドを導入した上皮細胞からは、プラスミド脱落効率は細胞周期ごとに25%以上であった。我々の実験からEBVを感染させたB細胞からの脱落効率はこの約半分であった。これは、oriPプラスミド複製・維持効率は上皮細胞系での一過性導入実験とB細胞でのEBV感染系では質的に異なることを示唆する。EBVはプラスミドと異なり、EBNA1 / oriPシステム非



依存的に複製できる。例えばRaji細胞に感染するEBVの複製がoriPに非依存性であることが報告されている。また、Heinzelらは長いDNA断片は多くの複製起点を供与しDSを機能的に肩代わりしやすいことを報告している。さらに、B細胞ではEBVゲノムの複製効率が高い、もしくはEBVゲノムの娘細胞への分配効率が高い可能性も否定できない。現在これを直接的に支持する報告はない。しかし、EBNA1がEBVゲノムの複製・維持に機能を発揮するために宿主因子を必要とすることは明らかであるため、宿主因子の存在比率等の影響によりB細胞ではEBVゲノム複製効率や娘細胞への分配効率が特徴的な振る舞いをするのかもしれない。これらのデータはEBVゲノムがEBNA1非依存的な複製・維持しやすいことを示しており、より自然に近い状態を再現したEBV感染実験によって得られたデータはoriPプラスミドを利用した既報がどのようなファクターによって影響をうけるかを示唆する重要な知見であると考えられる。以上をまとめると、おそらく本実験系では(1) - (2) のどちらかもしくは両方の可能性の影響があったと推測される。(1)を検証するためには、EBVに潜伏感染したGD / GFP細胞からEBVゲノム - EBNA1複合体を抽出し、実際にEBNA1 BSに結合しているEBNA1数を定量する必要がある。(2)を検証するためには、EBV感染細胞からEBVゲノムを回収し、2次元電気泳動 / サザンブロット法による複製起点の検索を行う必要がある。細胞種特異的なEBVゲノム挙動を検証するためには、宿主因子の存在比率の違うB細胞同士や他細胞種などでEBV感染後のウイルスゲノムの挙動を解析する必要がある。EBV持続感染予防効果について:安定したoriP

レプリコンの樹立は、プラスミドを導入された細胞の数 %しか達成できないことが一過性のトランスフェクションで示されている。これをestablishment効率と呼ぶ。Leightらによると、上皮系細胞へのoriPプラスミド導入実験では、establishment効率は約1-10 %程度であると報告されている。この現象はB細胞株にEBVを感染させたときにも同様に観察される。このestablishment効率をGDが低下させるのであれば、GDは悪性形質関連EBV遺伝子発現を阻止するだけでなく、EBV持続感染も阻止できると結論できる。

EBV関連リンパ腫予防薬開発の分子標的としてのEBNA1:EBVは多くの予後不良の疾患の原因として知られている。多くの成人では不顕性かつ慢性的に感染するものの悪性疾患

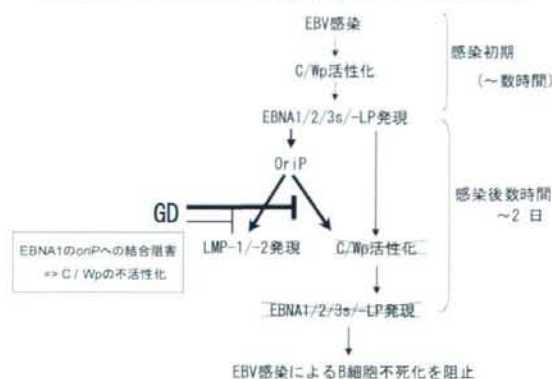


Fig. 4 Dominant-negative EBNA1作用機序モデル

EBNA1機能阻害がEBV関連リンパ腫およびEBV関連疾患の予防分子標的となり得ることが世界で始めて実証された(図4)。これを実用化するためには、dnE1と同様の機能をもつ小分子化合物をスクリーニングし、EBNA1阻害剤を得ることが必要である。EBNA1のタンパク質主体構造はX線解析により既に同定されている。これを基にEBNA1核酸結合を阻害する化合物か、EBNA1の2量体を阻害する化

化合物をデザインし、EBVによるV細胞不死化抑制能力および不死化したB細胞増殖抑制能力を評価すればよい。このような化合物が dominant negative EBNA1 "mimic"として作用させる際に細胞生理学的副作用の懸念は低いことが本研究であわせて示された。

実際、EBNA1阻害剤が開発できたとしたら、どのように使用するのが最も効果的だろうか？予防のため長期間にわたり服薬するのは費用対効果が悪く、現実的ではない。予防的投薬にはPTLDと死因の上位を占めるエイズリンパ腫の予防が最も効果的と思われる。PTLDなどでは免疫抑制剤から離脱できない期間に限定的に免疫抑制剤と併用することが現実的だと思われる。実際には移植前の免疫抑制剤開始以前からレシビエントに予防的投与を行うのが効果的であろう。エイズリンパ腫を予防するためには、エイズ患者が多剤併用療法 (High Active Anti-Retroviral Therapy : HAART)と共に常にEBNA1阻害剤を服用することが実際的と考えられる。EBNA1阻害剤はEBV関連疾患の治療にも応用できるため、治療用として使用するのももちろん可能である。一剤で予防と治療の2つの効果を持つ優れた薬剤となることが期待できる。

現在エイズリンパ腫における日本人の最適化に化学療法が確立していない。また、その予防方法も存在しない。しかし、リスクファクターが明らかなリンパ腫はEBV陽性B細胞性腫瘍である。エイズに合併するリンパ腫の約半数がEBV陽性B細胞リンパ腫であることから、EBNA1 "mimic"の有用性は高いと思われる。今後はヒト化マウスにおける dominant-negative EBNA1によるEBV感染の抑止について検討していきたい。

## E. 結論

本研究により、エイズリンパ腫の治療と予防のためにEBVのEBNA1は治療標的になることが判明した。我々の使用した dominant negative EBNA1と同様の作用機序を持つ小分子化合物を創成することにより、EBV関連Bリンパ腫予防・治療薬に使用できると思われる。EBNA1の機能阻害がリンパ腫の発生を予防するための良い分子標的の足りえることが示唆された。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

論文発表

- 1) Fuji H, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tatsumi J, Hoshino T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester inhibit RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. J Med Chem (in press)
- 2) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. FEBS Let (in press)
- 3) Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, Komano J. Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in the targeted metastasis. Cancer Sci (in press)
- 4) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Substitution of the myristoylation signal of human



immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. J Gen Virol (in press)

5) Emiko Urano, Saki Shimizu, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoko Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. AIDS. May 31; 22(9):1081-3, 2008.

6) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Kei Sato, Yoshiharu Miura, Yoshinori Ando, Jun Aoki, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. Traffic. Apr; 9(4):540-58 2008.

1. 学会発表  
(国際学会)

1) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yuetsu Tanaka and Yoshio Koyanagi. A CD63 MUTANT INHIBITS CXCR4 TRAFFICKING TO THE PLASMA MEMBRANE AND BLOCKS X4 HIV-1 ENTRY. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY

2) Emiko Urano, Yuki Kariya, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY

3) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto and Jun Komano. FUNCTIONAL SUBSTITUTION OF THE MYRISTOYLATION SIGNAL OF HIV-1 GAG WITH PHOSPHOLIPASE C DELTA 1 PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAIN. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY

(国内学会)

1) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

2) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta 1 pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

3) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫